

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента**  
**доктора медицинских наук, доцента,**  
**заведующей кафедрой патологической физиологии**  
**имени академика А.А. Богомольца**  
**ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет**  
**имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения**  
**Российской Федерации**  
**Афанасьевой Галины Александровны**  
**на диссертацию Стецюра Инны Юрьевны**  
**«ДИСТАНЦИОННО ПЕРЕМЕЩАЕМЫЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ**  
**ЭФФЕКТА ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ**  
**СВЕТА**  
**ДЛЯ *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЙ»,**  
**представленную на соискание ученой степени кандидата физико-**  
**математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика**

**Актуальность темы исследования**

Актуальность темы диссертационной работы Стецюра И.Ю. определяется необходимостью разработки нового вида мобильных и биологически совместимых платформ на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) для повышения информативности вне- и внутриклеточных исследований в биофизике клетки и биофизике сложных систем.

Методики спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), в частности, спектроскопии ГКР, широко известны своими возможностями высокоразрешающей визуализации и высокоточного определения веществ даже при их низкой концентрации.

Прогресс в области применения ГКР в медицине и биологии связан с разработкой новых наноструктурированных материалов в качестве платформ для получения эффекта ГКР света.

В настоящее время необходимо совершенствование перемещаемых сенсорных систем нового поколения, которые обеспечат высокие фактор

усиления, генерацию воспроизводимого и равномерного сигнала, стабильность в течение срока хранения, а также простоту изготовления, возможность использования лазера с длиной волны, соответствующей окну прозрачности биологической ткани, биосовместимость, возможность эффективного выведения из живого объекта составных компонентов и т.д.

Результаты диссертационного исследования Стецюра И.Ю. являются актуальными, поскольку позволили разработать и создать новый вид мобильных и биосовместимых платформ ГКР на основе структур «ядро-оболочка». Автором проведены синтез нового типа платформ для ГКР и оптимизация параметров, продемонстрирована эффективность их использования для исследования живых клеток.

### **Оценка содержания и оформления диссертации**

Диссертационная работа Стецюра И.Ю. состоит из введения, обзора литературы по проблемам исследования (глава 1), описания методик получения платформ для ГКР и методов их исследования (глава 2), четырех глав с оригинальными результатами и их обсуждением (главы 3-5), заключения, списка литературы. Диссертация изложена на 134 листах текста, содержит 56 рисунков и 4 таблицы. Список литературы представлен 179 источниками.

Первая глава диссертационной работы, посвященная обзору литературы, содержит современные представления об эффекте ГКР, взаимодействии лазерного излучения с нано-, микрочастицами и биообъектами. Подробный анализ данных литературы подчеркивает актуальность цели и задач исследования Стецюра И.Ю.

Во второй главе описаны использованные в работе материалы и методы получения микрочастиц, использованных в качестве «ядра» сенсоров, формирования нанокompозитных оболочек. Описаны современные методики исследования образцов с помощью сканирующей электронной микроскопии, спектроскопии КР, энергодисперсионного и рентгенофазового анализа, а также

установка оптического пинцета, культивирования и измерения жизнеспособности клеток.

Третья глава посвящена описанию процессов создания и характеристики платформ для ГКР, подготовки и тестирования образцов сенсоров с различным количеством слоев углеродных наночастиц.

Получены результаты, свидетельствующие о том, что число циклов адсорбции аддуктов нанокластеров углерода влияет на спектры КР и морфологию поверхности структур «ядро-оболочка» и позволяют получить наиболее эффективную платформу ГКР.

Важным итогом работы является подбор платформ, для которых может быть использован диапазон мощностей излучения, позволяющий исследовать биологические объекты без их повреждения, в том числе *in vivo*, например, анализ интерфейса ткань-имплант. Полученные платформы ГКР могут использоваться в качестве биосенсоров для картирования и снятия одиночных спектров. Приведены результаты исследования веществ, используемых в целях получения матриксов для выращивания клеточных культур, рассчитаны аналитические факторы усиления.

В четвертой главе показана возможность перемещения ГКР платформ на основе структур «ядро-оболочка» в клеточной среде с помощью оптического пинцета. Автором изучено влияние состава «ядра» и металлического покрытия платформы ГКР на возможность передвижения с помощью оптического пинцета в культуральной среде. Проанализированы результаты исследования цитотоксичности различных сенсоров. Были получены спектры КР клеток при минимальной мощности лазера с длиной волны 785 нм. Указанная мощность лазера является чрезвычайно низкой и не может нанести повреждений живым тканям и клеткам, в тоже время были получены четкие спектры самих сенсоров, липидов и нуклеиновых кислот.

Пятая глава посвящена исследованию возможностей управления взаимным расположением платформ ГКР под воздействием постоянного магнитного поля для создания тканевых инженерных конструкций. Проведена

большая работа по подготовке различных образцов «ядер» субмикронного размера с включениями из наночастиц нестабилизированного магнетита и магнетита, стабилизированного лимонной кислотой. Результаты тестирования на цитотоксичность показали, что культивирование клеток в присутствии платформ ГКР, содержащих различное количество стабилизированного и нестабилизированного магнетита, не уменьшает существенно жизнеспособность клеток мышечных фибробластов L929. Получены матрицы с включениями из сенсоров, содержащих наночастицы магнетита, и продемонстрировано сохранение платформами ГКР усиливающих свойств после растворения матрикса нетканого материала.

В заключении представлены основные результаты и выводы. Выводы научно обоснованы, являются обобщением полученного экспериментального материала и верно отражают результаты проделанной работы.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

### **Научная новизна**

В работе получен ряд новых научных результатов:

- созданы многофункциональные мобильные биосенсоры на основе эффекта ГКР, которые возможно использовать для мониторинга и гипертермии;
- платформы ГКР протестированы на реальных матрицах, используемых в тканевой инженерии;
- изучены цитотоксичность разных сенсоров и выбран их оптимальный состав;
- созданы биосовместимые нетканые материалы на основе поликапролактона с включениями из платформ ГКР;
- показана возможность перемещения платформ ГКР в культуральной питательной среде;
- проведено внутриклеточное исследование клеток мышечных фибробластов L929 с помощью полученных платформ ГКР;

- показана возможность управления с помощью магнитного поля взаимным расположением платформ ГКР на основе микрочастиц из карбоната кальция, содержащих наночастицы магнетита.

### **Обоснованность и достоверность положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Полученные результаты представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков в области биофизики, спектроскопии, медицины, имеют высокую степень достоверности, которая основывается на адекватной их интерпретации и тщательном анализе данных литературы. Достоверность результатов подтверждается корректным применением апробированных методик исследования с использованием современного оборудования, а также воспроизводимостью полученных данных в пределах установленных погрешностей.

Материалы диссертации достаточно широко представлены в печати: опубликовано 13 печатных работ, 5 из которых в изданиях, рекомендованных Министерством образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Кроме того, материалы диссертации были представлены на международных конференциях и семинарах (10 устных докладов и один постер).

### **Замечания**

По диссертационной работе Стецюра И.Ю. имеются следующие замечания:

1. В главе 4 продемонстрировано взаимодействие структур «ядро-оболочка» с культурой клеток линии L929 после их инкубации в течение 2 часов. Однако нет комментариев по поводу распределения полученных платформ внутри клеток и не приведена статистика интернализированных структур «ядро-оболочка».

2. В экспериментах с участием клеточных линий использовались мышинные фибробласты линии L929, хотя в работе нет аргументации в пользу этого выбора.

В процессе ознакомления с работой возникли следующие вопросы:

1. Проводился ли контрольный эксперимент, в котором демонстрировалось воздействие облучения лазером при тех же плотностях мощности на используемые клеточные культуры без использования платформ ГКР?
2. Из данных литературы известно, что полиаллиламин является токсичным полимером. Почему именно он выбран для формирования структур «ядро-оболочка»?
3. Проводились исследования (S.A. Kulkarni, S. Feng Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery // *Pharmaceutical Research*. 2013.V. 10. P. 2512-22; C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles // *Biomaterials*. 2010. V. 31. (13). P. 3657–3666), в которых показано, что частицы размером около 150 нм и дзета-потенциалом менее 15 мВ позволяют избежать фагоцитоза. Считаете ли Вы целесообразным исследование эффективности интернализации платформ в зависимости от их размера?
4. Снимались ли контрольные спектры КР в клеточной среде?
5. В работе утверждается, что полученные платформы возможно использовать так же и в целях гипертермии. Проводилась ли оценка локального нагрева при снятии спектров КР?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не умоляют достоинств и значения работы.

## Заключение

Диссертационная работа Стецюра Инны Юрьевны «Дистанционно перемещаемые сенсоры на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния света для *in vitro* исследований» представляет собой целостное оригинальное экспериментальное исследование, внесшее существенный вклад в развитие современной биофизики. Стоит отметить следующие результаты работы, имеющие большое фундаментальное и прикладное значение:

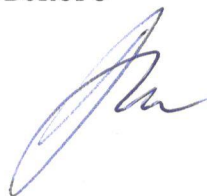
- созданы эффективные сенсорные платформы гигантского комбинационного рассеяния света;
- с помощью комбинационного рассеяния света исследованы сами платформы, а также матрицы, используемые в тканевой инженерии для выращивания клеток;
- рассчитаны аналитические факторы усиления;
- проведено локальное исследование клетки мышинных фибробластов линии L929 в зоне внутриклеточной доставки платформы с помощью оптического пинцета;
- отработана методика формирования микрочастиц карбоната кальция, содержащих наночастицы магнетита и показана возможность реализации управления пространственной ориентацией платформ ГКР и перемещением их под действием магнитного поля;
- исследована цитотоксичность всех полученных платформ для оптимизации их биосовместимости.

Диссертационная работа Стецюра И.Ю. выполнена на высоком методическом уровне, содержит решение всех поставленных перед автором задач и имеет большое прикладное значение. Диссертация представляет собой совокупность новых научных результатов и положений, выдвигаемых для публичной защиты, имеет внутреннее единство и свидетельствует о значительном личном вкладе соискателя.

По своей актуальности, научно-методическому уровню, новизне полученных результатов и практической значимости диссертация Стецюра

Инны Юрьевны «Дистанционно перемещаемые сенсоры на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния света для *in vitro* исследований» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Официальный оппонент,  
заведующая кафедрой патологической физиологии  
им. акад. А.А. Богомольца  
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского  
Минздрава России,  
доктор медицинских наук, доцент



Афанасьева Г.А.  
26.08.2016 г.

410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112. ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ  
им. В.И. Разумовского Минздрава России

E-mail: [meduniv@sgmu.ru](mailto:meduniv@sgmu.ru) <http://www.sgmur.ru>

Тел. : (8452)-66-97-68

Подписи  
ЗАВЕРЯЮ:  
Начальник О

